

红霉素链霉菌噬菌体的分离和鉴定

张筱玉 邹美云 李文筠 俞学琴

(上海第三制药厂, 上海)

陈孝康

(复旦大学遗传研究所, 上海)

我们从红霉素的异常发酵液中分离到 14 株红霉素链霉菌噬菌体。对每一噬菌体进行了纯化, 并描述了噬菌斑的形态。大部份噬菌体的噬菌斑大而清晰透明, 而 P_4 、 P_8 、 P_{10} 的噬菌斑小而呈半透明。根据血清中和反应试验, 这些噬菌体可区分为三种血清类型。选择三种血清型的代表噬菌体做热失活及 pH 稳定性试验, 结果表明: 三种类型的噬菌体对热的失活呈明显差异, 而对 pH 的适应性较为广泛。寄主范围测定结果, P_4 、 P_8 噬菌体对多种抗生素产生菌能感染, 为一多价噬菌体, P_{10} 仅对红霉素链霉菌能感染, 为单价噬菌体。

在红霉素生产过程中出现噬菌体的感染, 并选育抗噬菌体的菌株用于工业生产已有一些报道^[1, 2]。分离的噬菌体用电子显微镜观察均呈蝌蚪形状, 但对它们的生物学特性很少有系统描述。有关灰色链霉菌噬菌体的报道较多。Alexander 和 McCoy^[3] 对作用于灰色链霉菌的 7 株噬菌体通过血清学方法可区分为三种血清型。Koerder 等^[4] 研究了一系列的灰色链霉菌噬菌体, 这些噬菌体可分为二类, 都是呈蝌蚪形, 仅大小有差异, 其中第一类型比第二类型有一较长而平的头部及一较长的尾巴, 但有关它们的生物学特性无系统描述。

我们从红霉素异常发酵液中分离到 14 株红霉素链霉菌噬菌体。利用血清学方法对这些噬菌体进行分型。确定了三株不同血清型的代表, 并进行了一系列有关生物学特性的研究, 这些结果对预防工作和选育抗噬菌体菌株提供了依据。

材料和 方法

(一) 菌株和培养条件

以红霉素产生菌 *Streptomyces erythraeus* 32P-

102 为指示菌, 斜面培养温度为 37°C, 种子培养温度为 28°C, 在旋转式摇床培养 48 小时。以双层琼脂法分离噬菌体。

测定寄主范围所用的菌株有新霉素、制霉菌素、庆大霉素、链霉素、卡那霉素、争光霉素、四环素及麦迪霉素等产生菌, 它们依次为 *S. fradiae* 7-12、*S. noursei* 2、*M. purpure* 6-29、*S. griseus* 43-5、*S. kenamycetius* 41、*S. verticillus* 4-52、*S. aureofaciens* S-10 及 *S. mycarofaciens* 3-30-2。斜面孢子分别在 28°C 或 37°C 培养。

(二) 培养基

红霉素链霉菌所用的斜面培养基组分 (%) 为: 玉米浆 1.0 (湿重)、淀粉 1、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.3、NaCl 0.3、 $CaCO_3$ 0.25、琼脂 2.2, pH 7.0—7.2。种子培养基组分 (%) 为: 黄豆饼粉 1.5、淀粉 4.0、糊精 2.0、葡萄糖 1.0、蛋白胨 0.5、NaCl 0.4、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.25、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025、 KH_2PO_4 0.02、 $CaCO_3$ 0.6, pH 7.8—8.0。其他菌株所用的斜面孢子培养基是: 新霉素链霉菌用牛肉膏。蛋白胨培养基; 制霉菌素链霉菌用麸皮无机盐培养基; 庆大霉素产生菌用淀粉无机盐培养基; 卡那霉素链霉菌用牛肉膏培养基; 灰色链霉菌用豌豆浸出液培养基; 金色链霉菌及争光霉素产生菌用麸

本文于 1979 年 10 月 10 日收到。

皮培养基。

(三) 噬菌体

从红霉素发酵自溶液中分离出红霉素链霉菌噬菌体。噬菌体试验用的培养基: 底层培养基组分(%)为: 牛肉膏 0.3、蛋白胨 1.0、NaCl 0.5、琼脂 2.2, pH7.1。上层培养基组分(%)为: 淀粉 1.0、蛋白胨 0.2、NaCl 0.1、NaNO₃ 0.1、K₂HPO₄ 0.1、MgSO₄·7H₂O 0.05、FeSO₄ 0.001、琼脂 1.0, pH7.8—8.0。

(四) 抗血清制备和血清中和试验

按照 Adams^[9] 方法进行。

(五) 热失活测定

参照余茂效等^[6]报道的方法。

(六) pH 稳定性试验

参照余茂效等^[6]报道的方法, 以 1% 脓液为介质, pH 用 NaOH 或 HCl 调节。

(七) 寄主范围测定

采用琼脂平皿点滴法及双层琼脂法测定。分别取 10⁸、10⁷ 单位/毫升的噬菌体液各 0.01 毫升, 点滴在上层含被测菌孢子的平皿上, 经培养后观察溶菌现象。采用双层法测定时, 加入 0.1 毫升噬菌体, 观察有无噬菌斑出现。

实验结果

(一) 噬菌体的分离及纯化

取红霉素异常发酵液, 经赛氏过滤器过滤得无菌滤液, 用双层琼脂法测定有噬菌斑出现, 证明有噬菌体感染。由此得的噬菌体连续单斑挑取三次以上进行纯化, 待噬菌斑的形态和大小大致稳定一致后, 可以认为已纯化。以此纯化的噬菌体复制使浓度达 10¹⁰ 单位/毫升以上, 将此噬菌体置 4℃ 冰箱保存并供试验用。

多年来, 在红霉素生产过程中, 先后出现过多次噬菌体的感染, 除我厂以外, 亦收集了其它厂出现的噬菌体。噬菌体编号分别为 P₁、P₃、P₄、P₅、P₆、P₇、P₈、P₉、P₁₀、P₁₁、P₁₂、P₁₃、P_{d1} 及 P_{d2}。在试验条件一致的情况下, 根据噬菌斑的形态, 可以看出 P₁、P₃、P₅、P₆、P₇、P₉、P₁₁、P₁₂、P₁₃、P_{d1}、P_{d2}

的噬菌斑大, 清晰透明; P₄、P₈、P₁₀ 的噬菌斑小、呈半透明, 且形成噬菌斑的时间较长^[7]。

(二) 血清中和反应试验

我们将每一株经纯化的噬菌体制备抗血清, 根据血清交叉中和反应试验可以区分为三种血清类型。三型的代表按分离样品编号为 P₄、P₉、P_{d1}。这些噬菌体中, P₄、P₈、P₁₀ 属于 P₄ 型; P₁、P₃、P₅、P₆、P₇、P₉、P₁₁、P₁₂、P₁₃ 属于 P₉ 型; P_{d1}、P_{d2} 属于 P_{d1} 型。

P₄、P₉、P_{d1} 三株噬菌体的抗血清交叉中和反应结果, 说明它们在血清学上是不

表 1 P₄、P₉、P_{d1} 三株噬菌体的抗血清交叉中和反应

| 噬菌体 抗血清 (1:100) | P ₄ | P ₉ | P _{d1} |
|----------------------------|----------------|----------------|-----------------|
| P ₄ K = 300 | 0 | 272 | 348 |
| P ₉ K = 790 | 270 | 0 | 351 |
| P _{d1} K = 570 | 234 | 253 | 0 |
| 对照 | 263 | 267 | 336 |

表 2 P₁₀ 噬菌体抗血清与 P₄、P₈、P₁₀ 的中和反应

| 噬菌体 抗血清 (1:100) | P ₄ | P ₈ | P ₁₀ |
|----------------------------|----------------|----------------|-----------------|
| P ₁₀ K = 216 | 0 | 0 | 0 |
| 对照 | 284 | 347 | 263 |

表 3 P₉ 噬菌体抗血清与 P₁、P₃、P₅、P₇、P₉、P₁₁、P₁₃ 的中和反应

| 噬菌体 抗血清 (1:100) | P ₁ | P ₃ | P ₅ | P ₇ | P ₉ | P ₁₁ | P ₁₃ |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| P ₉ K = 790 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 对照 | 560 | 900 | 551 | 297 | 667 | 306 | 869 |

相同的。如表 1 所示,表中数字表示每个平皿噬菌斑的平均数目。

相同血清型的噬菌体,其抗血清中和反应如表 2、表 3 所示。

(三) 热失活比较

选择三型的代表噬菌体 P_4 、 P_9 、 P_{d_1} 分别测定它们在不同温度下的存活率。我们发现三种血清型的噬菌体对热失活呈现明显差异。 P_4 噬菌体在 60°C 60' 存活率仍为 100%, 70°C 20' 存活率为 43%, 30' 存活率 30%, 至 40' 时尚存活 7.8%, 在 80°C 经 10' 存活 0.103%, 至 90°C 10' 才几乎完全失活。而 P_{d_1} 噬菌体在 50°C 1 小时之内无失活现象, 60°C 20' 存活 75.2%, 至 30' 存活 1.13%, 60' 尚存活 0.61%。 P_9 噬菌体在 50°C 1 小时之内无失活现象。 60°C 10' 存活 0.23%, 20' 仅存活 0.09%。因此,从热失活试验的结果指出, P_9 噬菌体对热最敏感, P_{d_1} 次之, P_4 最不敏感。如表 4。

(四) 对 pH 稳定性的测定

溶液的酸碱度对于噬菌体的稳定性具

有显著的影响。 P_4 、 P_9 、 P_{d_1} 三株噬菌体在 pH 5.0—13.0 范围内较为稳定。 P_4 、 P_9 在 pH 14.0 仍不失活,一般在 pH 偏高时较偏低时稳定,在 pH 3.0 以下均失活。如下图。

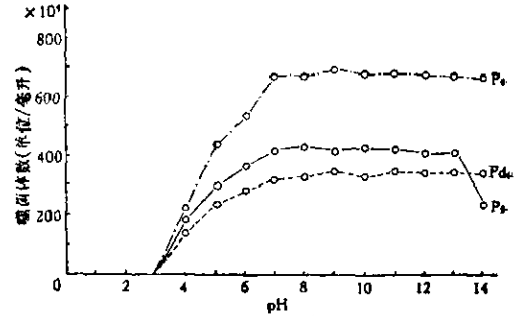


图 1 不同 pH 处理下噬菌体存活率比较

(五) 寄主范围测定

寄主范围以点滴法及双层琼脂法同时测定。分别用 P_4 、 P_9 、 P_{d_1} 三株噬菌体感染不同的放线菌,这些放线菌都是几种常用抗生素的生产菌株,试验结果如表 5 所示。 P_4 、 P_9 噬菌体除能感染红霉素链霉菌外还能感染新霉素、制霉菌素、庆大霉素、争光霉素、四环素及麦迪霉素等产生菌,为一多

表 4 P_4 、 P_{d_1} 、 P_9 噬菌体的热失活存活率

| 噬菌体 | 存活率 (%) | 时间 (分) | | | | | |
|-----------|---------|--------|-------|-------|-------|------|------|
| | | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| P_4 | 60°C | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 70°C | 66.7 | 43 | 30 | 7.8 | — | — |
| | 80°C | 0.103 | — | — | — | — | — |
| | 90°C | 0.003 | — | — | — | — | — |
| P_{d_1} | 50°C | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 60°C | 100 | 75.2 | 1.13 | 0.91 | 0.81 | 0.61 |
| | 70°C | 0.061 | 0.035 | 0.011 | — | — | — |
| | 80°C | 0.038 | 0.006 | — | — | — | — |
| | 90°C | 0.0002 | — | — | — | — | — |
| P_9 | 50°C | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 60°C | 0.23 | 0.09 | 0.07 | 0.013 | — | — |
| | 70°C | 0.008 | — | — | — | — | — |
| | 80°C | 0.005 | — | — | — | — | — |
| | 90°C | 0 | — | — | — | — | — |

表5 P₁、P₉、P_{d1} 噬菌体寄主范围测定

| 被 测 菌 株 | 噬 菌 体 | | |
|-------------------------------|----------------|----------------|-----------------|
| | P ₁ | P ₉ | P _{d1} |
| <i>S. fradiae</i> 7-12 | + | + | - |
| <i>S. noursei</i> S-2 | + | + | - |
| <i>M. Purpure</i> 6-29 | + | + | - |
| <i>S. griseus</i> 43-5 | - | - | - |
| <i>S. kenamyceticus</i> 41 | - | - | - |
| <i>S. verticillus</i> 4-52 | + | + | - |
| <i>S. aureofaciens</i> S-10 | + | + | - |
| <i>S. mycrofaciens</i> 3-30-2 | + | + | - |
| <i>S. erythreus</i> 32P-102 | + | + | + |

*“+” 感染; “-” 不感染。

价噬菌体, 而 P_{d1} 噬菌体仅感染红霉素产生菌为一单价噬菌体。

讨 论

在抗生素工业生产中出现噬菌体的感染愈来愈多。国内自 1966 年红霉素生产出现噬菌体感染以来, 金霉素、四环素、庆大霉素、卡那霉素、洁霉素等的生产中亦相继发生, 有的严重地影响了生产。我们系统地收集了红霉素生产过程中出现的噬菌体, 并对每一噬菌体进行纯化, 制备了抗血清, 根据血清学方法可区分为 P₁、P₉、P_{d1} 三种血清型。属于 P₉ 型的噬菌体最多而且对生产危害大, 因此选育抗 P₉ 型噬菌体的菌株具有现实意义, 更重要的是必须选育抗多种血清型噬菌体的菌株, 以预防噬菌体的感染。因此, 对生产上出现的噬菌体必须加以收集、保存。同时对分离的噬菌体进行血清学研究是提供选育抗性菌株的依据。根据寄主范围测定, P₁、P₉ 噬菌体能感染较多的抗生素产生菌, 因此对这些噬

菌体应特别注意保存, 以免危及生产。

温度对噬菌体的敏感性与宿主的温度耐受范围有密切的关系。不同的放线菌噬菌体其致死温度有所不同。Alexander 等^[3]利用热反应对放线菌噬菌体分类, 但 Thiemann 等^[6]认为根据温度失活率不足以对地中海放线菌的分类。我们通过热失活试验, P₁、P₉、P_{d1} 三株噬菌体对温度呈现不同的敏感性。因此, 如果在生产上感染噬菌体后, 利用噬菌体的致死温度可以对培养基进行处理后重复使用。三株噬菌体对 pH 的敏感性无甚差别, 在碱性条件下都不失活, 特别是 P₁、P₉ 噬菌体在 pH13、pH14 亦不失活, 此点与金色链霉菌噬菌体不同^[9]。这三株噬菌体在 pH3 以下均失活, 但在此条件下, 亦不利红霉素链霉菌的生长, 因此不能利用 pH 的改变来预防噬菌体的感染。

参 考 文 献

- [1] Раутенштейн, Я. И., И.Т.Д.: *Микробиология*, 31: 49, 1962.
- [2] Раутенштейн, Я. И. и Ретиняева, В. И.: *Микробиология*, 32: 642, 1963.
- [3] Alexander, R. R. and E. Messo, *J. Bacteriol.*, 72: 378, 1956.
- [4] Koeber, W. L. et al.: *J. Bacteriol.*, 60: 29, 1950.
- [5] Adams, M. H.: *Bacteriophages*, Interscience Publishers, Inc., New York, 1959, pp. 98—109.
- [6] 余茂效等: *微生物学报* 14(2):216—223, 1974年。
- [7] 张筱玉等: *微生物学报* 14(1):83—50, 1974年。
- [8] Thiemann, J. E. et al.: *Appl. Microbiol.*, 12: 269, 1964.
- [9] 余茂效等: *微生物学报* 18(2):153—157, 1978年。

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHAGES ATTACKING *STREPTOMYCES ERYTHREUS*

Zhang Xiaoyu, Zou Minyun, Li Wenyun and Yu Xueqin

(*The Shanghai No. 3 Pharmaceutical Plant*)

Chen Xiaokang

(*Institute of Genetics, Fu Dan University*)

Fourteen cultures of phages attacking *Streptomyces erythreus* were isolated from the abnormal fermentation broth in erythromycin production. Every phage was purified and described morphologically. The phage plaque of most phages were big, evident and transparent, but the phage plaque of P₄, P₈ and P₁₀ were small and translucent. According to the serological neutralization reaction, these phages could be divided into three serotypes (P₄, P₈ and Pd₁). Representative phages of these three

serotypes were selected to test their thermal-inactivation and stability at different pH values. The results were as follows: the three serotypes of phages reacted dissimilarly to thermal inactivation but with a wider pH range of adaptability. Host range of these three serotypes of phages were also tested. P₄ and P₈ were polyvalent, being infective to many of the antibiotics producing species; while Pd₁ was monovalent, being infective to *Streptomyces erythreus* only.